

$G\gamma$ - und $A\gamma$ -Globine im Hämoglobin F
von Feten und Neugeborenen
und ihre Korrelation mit der
Hb F-Hb A_1 -Umschaltung

Christian Schneider

1984

1985

Diss
München

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. Spiess

γ^G - und γ^A -Globine im Hämoglobin F

von Feten und Neugeborenen

und ihre Korrelation mit der Hb F-Hb A₁-Umschaltung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde in der
gesamten Medizin an der Ludwig-Maximilians Universität zu
München .

vorgelegt von

Christian Schneider aus Meschede

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Jensen

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Spiess

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.1985

Herrn Prof. Dr. med. Michael Jensen danke ich für die Überlassung des Themas, für jederzeit freundliche Unterstützung und wertvolle Kritik.

Ganz besonderer Dank gebührt Frau Heidi Ritzefeld für ihre unentbehrliche und stets freundliche Hilfe bei der experimentellen Laborarbeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554811_0041

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Die normale Hämoglobinkonstellation

1.1.1. beim Erwachsenen

1.1.2. beim Feten

1.1.3. Anteile von γ im Hb F des Feten und Erwachsenen

1.2. Fragestellung

2. Material und Methoden
 - 2.1. Blutgewinnung
 - 2.2. Aufbereitung der Erythrozyten
 - 2.2.1. Radioaktive Markierung
 - 2.2.2. Hämolyse und Globinpräzipitation
 - 2.3. Herstellung der Elektrophoresegele
 - 2.3.1. Tritoneffekt
 - 2.4. Aufbereitung des Globins für die Elektrophorese
 - 2.4.1. Färbeprozess und densitometrische Messung
 - 2.5. Bestimmung der Verhältnisse $\frac{{}^6\gamma}{{}^6\gamma + {}^{17}\gamma}$ und $\gamma/\gamma + \beta$
 - 2.6. Messung der in den einzelnen Globinen enthaltenen Radioaktivität und Bestimmung der "relativen Globin-Biosynthese-Raten"

3. Ergebnisse

3.1. Bandenidentifizierung

3.2. Densitometrische Bandenmuster eines Feten und eines Neugeborenen

3.3. Die $\frac{{}^G\gamma}{{}^G\gamma + {}^H\gamma}$ Verhältnisse bei Feten und Neugeborenen

3.3.1. Die relativen Anteile von ${}^G\gamma$ und ${}^H\gamma$ im Hb F

3.3.2. Die relativen Syntheseraten von ${}^G\gamma$ und ${}^H\gamma$

3.4. Der Hb F Anteil bei Feten und Neugeborenen

3.5. Korrelation zwischen $\frac{{}^G\gamma}{{}^G\gamma + {}^H\gamma}$ und dem Anteil an Hb F

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Verzeichnis der verwendeten Literatur

1. Einleitung

1.1. Die normale Hämoglobinkonstellation

1.1.1. Beim Erwachsenen

Das Hämoglobinmolekül besteht aus vier Polypeptidketten (Globinen), die jeweils eine prosthetische Gruppe, das Häm, enthalten.

Ihre Synthese wird durch mindestens sechs Genpaare kontrolliert (18), die für die Bildung von verschiedenen Polypeptidketten vom Typ α , β , γ^G , γ^N und δ verantwortlich sind (5,21, 22). Das α -Globin-gen, lokalisiert auf Chromosom 16 (9), hat das ganze Leben über Aktivität, ausgenommen die ersten Wochen post conceptionem. Demgegenüber unterliegt die Genexpression der Nicht- α -Globingene, als Verband auf Chromosom 11 lokalisiert (18), zeitlichen Änderungen.

Die α -Kette besteht aus 141 Aminosäuren, die β -, γ - und δ -Kette, auch als Nicht- α -Ketten zusammengefaßt, aus 146 Aminosäuren. Die γ -Globinketten des Hb F enthalten an Position 136 entweder die Aminosäuren Glycin- γ - oder Alanin- γ -. Sie stammen von zwei nicht allelen Globingenen, die eng benachbart in der o.a. γ -, δ -, β -Globingengruppe gemeinsam auf Chromosom 11 liegen.



Abb. 1.1 Modell für den Molekülaufbau des Hämoglobins. Nach Perutz (19)

Entsprechend der unterschiedlichen Zusammensetzung der verschiedenen Globine im tetrameren Hämoglobinmolekül existieren nebeneinander verschiedene genetisch determinierte Hämoglobine: Das Hämoglobin A_1 enthält zwei α -Ketten und zwei β -Ketten und macht über 95% des Hämoglobins beim Erwachsenen und Kleinkind jenseits des ersten Lebensjahres aus. Hämoglobin A_2 besteht aus zwei α -Ketten und zwei δ -Ketten. Sein Anteil am Gesamthämoglobin beträgt bis 3%. Hämoglobin F, bestehend aus zwei α -Ketten und zwei γ -Ketten, ist beim Erwachsenen nur in Spuren nachweisbar (vgl. Tab. 1)

Hb A_1	$2\alpha\ 2\beta$	> 95% des Gesamt-Hb
Hb A_2	$2\alpha\ 2\delta$	bis 3% des Gesamt-Hb
Hb F	$2\alpha\ 2\gamma$	< 1% des Gesamt-Hb

Tab. 1 Die normalen genetischen Hämoglobinvarianten beim Erwachsenen

Entsprechend dieser Verteilung werden beim gesunden Erwachsenen in den erythroiden Zellen des Knochenmarks und des peripheren Blutes α - und β -Ketten im Verhältnis 1:1 synthetisiert (24).

1.1.2. Beim Feten

Etwa von der 8. SSW bis zur Geburt ist Hb F überwiegendes Hämoglobin beim Feten. Daneben werden in den ersten Wochen der Embryonalentwicklung sogenannte embryonale Hämoglobine gebildet (10,11,17). Der Anteil von Hb F beträgt etwa bis zur 32. SSW ca. 90% des Gesamt-Hb und nimmt dann, zunächst langsam, ab. Hb A₁ ist beim Feten ab der 6. SSW nachweisbar, von der 12.-32. SSW beträgt sein Anteil ziemlich konstant etwa 10%, bei reifen Neugeborenen ca. 30%, um dann innerhalb des ersten Lebensjahres auf Werte über 95% anzusteigen - Hb F-Hb A₁-Umschaltung - (4,6). (Abb. 1.2)

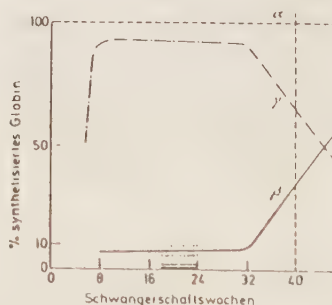


Abb. 1.2 In vitro Globinsynthese in fetalen erythroiden Zellen. Zusammengestellt nach Cividalli et al. (7) und Jensen et al. (14). (Aus: Jensen, Zahn : Pränatal-diagnostik ... (15))

Entsprechend dem geringen Anteil von Hb A₁ im Blut von Feten bildet die β -Globinsynthese nur einen Bruchteil der α - bzw. γ -Globinsynthese. Cividalli und Mitarbeiter untersuchten die Syntheseraten bei Feten zwischen der 6.-16. SSW (7). Sie fanden dabei ein β/γ -Syntheseverhältnis von 0.06-0.10. In Abhängigkeit von der Scheitel-Steiß-Länge registrierten sie einen leichten linearen Anstieg des β/γ -Syntheseverhältnisses.

1.1.3. Anteile von γ^G im Hb F des Feten und Erwachsenen

Die Anteile beider γ -Ketten im Hb F des Feten unterscheiden sich von denen des Hb F des Erwachsenen:

Bei ersterem macht γ^G ca. 70% des gesamten γ -Globins aus ($\gamma^G / \gamma^G + \gamma^A = 0,7$) aus, in der kleinen Hb F-Fraktion des Erwachsenen sind es nurmehr 40% ($\gamma^G / \gamma^G + \gamma^A = 0,4$). (23)

Demnach gibt es zusätzlich zu den Umschaltungen vom Hämoglobin des Embryos zu dem des Feten und von dem des Feten zum Hämoglobin des Erwachsenen im Verlauf der menschlichen Entwicklung eine weitere Umschaltung in der Expression der Globingene, die dazu führt, daß die relativen Anteile der beiden γ -Globine im Hb F sich nahezu umkehren.

1.2. Fragestellung

Da einerseits der Anteil des γ^G -Globins beim Feten 70% ($\gamma^G/\gamma^G + \gamma^A = 0,7$) des gesamten γ -Globins ausmacht, es andererseits beim Erwachsenen nur noch 40% ($\gamma^G/\gamma^G + \gamma^A = 0,4$) sind, stellt sich die Frage nach dem Umschaltungszeitpunkt in der Expression der Globingene.

Die Beantwortung der Frage, wann diese Umschaltung erfolgt und ob eine Korrelation mit der Hb F-Hb A₁-Umschaltung (d.h. $\gamma \rightarrow \beta$) besteht, ist Gegenstand dieser Arbeit.

Es wurden deshalb die relativen Anteile der γ^G - und γ^A -Ketten des fetalen Hämoglobins bei Feten und Neugeborenen untersucht.

1.1. Blutgewinnung

Fetales Blut wurde durch Punktion eines Choriongefäßes während der Fetoskopie (16) gewonnen. Diese wurde in der 19.-22. SSW durchgeführt, um durch pränatale Diagnostik bei Feten mit genetischem Risiko eine β -Thalassämie auszuschließen.

Es wurde jedoch ausschließlich Blut von solchen Feten verarbeitet, bei denen sich der Verdacht auf eine homozygote und heterozygote β -Thalassämie nicht verifizieren ließ, die also gesund waren.

Von gesunden Neugeborenen der 38.-41. SSW wurde peripheres Venenblut durch Punktion entnommen und für diese Arbeit verwendet, wenn im Rahmen von Kontrollen die Bilirubinkonzentration gemessen wurde.

Aufbereitung der Erythrozyten

Die Globinsynthese findet in vivo zu ca. 99% im Knochenmark und zu ca. 1% in den Retikulozyten der Peripherie statt. Da die Synthesefähigkeit der Zellen in vitro rasch abnimmt, muß unmittelbar nach der Blutentnahme mit ihrer Aufbereitung begonnen werden.

Die Zellsuspension wurde mit 0,9% iger NaCl auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und nach Zählung eines Tropfens in der Zählkammer die Gesamtzahl der Erythrozyten in der Probe berechnet. Zwei zusätzliche Waschvorgänge dienten auch der weitgehenden Entfernung des im Serum enthaltenen Leucins, das die spezifische Aktivität von gegebenenfalls später zugesetztem radioaktiven Leucin verdünnen würde (siehe 2.2.1.).

2.2.1. Radioaktive Markierung

0,3 ml einer ³H-Leucin-Lösung¹ wurden im Vakuumexsikator getrocknet, die gewaschenen Erythrozyten dazu gegeben und mit zwei Erythrozytenvolumina "Mastermix"² aufgeschwemmt. Anschließend wurde zwei Stunden bei 37 Grad Celsius inkubiert. Dabei wurde das radioaktive ³H-Leucin von jungen, noch zur Synthese befähigten Erythrozyten in das neusynthetisierte Globin eingebaut (2).

Leucin wurde deshalb verwendet, weil es in allen Globinketten nahezu gleichoft vorkommt, je achtzehnmal in α - und β -Globin, siebzehnmal in γ -Globin.

1. L-Leucin-³H, NET 135 H, New England Nuclear Corp., Boston, Mass., USA

2. "Mastermix":

1 ml Krebs-Klinger-Phosphat-Puffer

0,4 ml Aminosäuremischung 19

4 mg Glucose

3.3.3. Hämolysse und Globinpräzipitation

Zur Entfernung von Inkubationsmedium, insbesondere ³H-Leucin, wurden die Erythrozyten dreimal in 0,9%iger NaCl gewaschen. Unter Zugabe von fünf Volumina 0,005 M MgCl₂ wurden die Erythrozyten unter Schütteln hämolysiert.

MgCl₂ wurde verwendet, um beim Hämolysieren möglichst wenig Verunreinigungen durch Leukozytenproteine zu erhalten, da die Leukozyten z.T. in diesem Medium nicht platzen und dementsprechend abzentrifugiert werden. Es wurde fünf Minuten zentrifugiert.¹ Der klare Überstand wurde abpipettiert, sein Volumen bestimmt.

Hämoglobin wurde durch Eintropfen des klaren Hämolysates in 2%iges HCl-Aceton-Mercaptoäthanol-Gemisch (bestehend aus 2 ml konzentrierter HCl, 8 Tropfen Mercaptoäthanol und 98 ml Aceton) bei -20 Grad C präzipitiert. Das Häm-freie Präzipitat (Globin) wird dreimal in kaltem Aceton gewaschen und mit N₂ getrocknet.

¹ Zentrifuge Eppendorf 5412

Herstellung der Elektrophoresegele

Zur Herstellung der Elektrophoresegele wurden nach der Methode von Rovera (20) 25 ml 8 M Harnstofflösung, 3 g Acrylamid und 93 mg Bisacrylamid in einem geeigneten Reaktionsgefäß verrührt. Dann wurden 0,125 ml TMED (Tetramethyläthylendiamin), 0,5 ml TX-100 (Triton X-100), 1,25 ml 96% ige Essigsäure und 2 ml H_2O zugegeben. Zuletzt wurden noch 0,8 ml 2% iges Ammoniumperoxidisulfat beigelegt.

Triton X-100 wurde deshalb verwendet, weil es bei der elektrophoretischen und chromatographischen Auftrennung die Aufspaltung des γ -Globins in $^G\gamma$ - und $^H\gamma$ -Ketten ermöglicht, denn normalerweise unterscheiden sich $^G\gamma$ - und $^H\gamma$ -Globine in ihren Wanderungseigenschaften nicht. Erst das nichtionische Detergens TX-100 ermöglicht also, wie Rovera (20) feststellte, die o.a. Aufspaltung. Dieses Phänomen wird als Tritoneffekt bezeichnet (Abb. 2.1A,B).

Nachdem das aufbereitete Gemisch entgast war, wurde es mit einer Pasteurpipette in die Elektrophorese-
röhrchen gefüllt, mit Aqua dest. überschichtet und über Nacht zur Polymerisation stehen gelassen.

1. TMED, Serva Feinbiochemika, Heidelberg

2. TX-100, Serva Feinbiochemika, Heidelberg

2.3.1. Tritoneffekt

Die Hinzugabe des nichtionischen Detergens Triton X-100 zur Pufferlösung ermöglicht die Aufspaltung der γ und δ -Globine (12). (Abb. 2.1A,B)

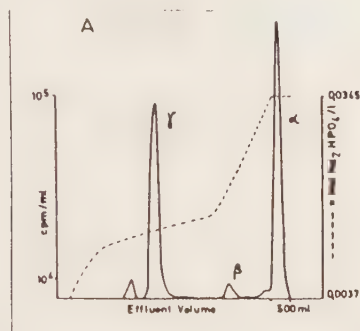


Abb. 2.1A Radiochromatogramm von Globin von normalem fetalen Blut. (Jensen (12))

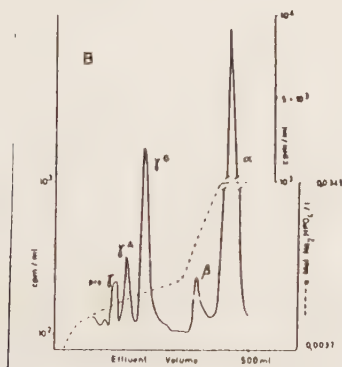


Abb. 2.1B Gleiche Probe wie in Abb. 2.1A unter Hinzugabe von 4% Triton X-100 zur Pufferlösung (Jensen (12))

2.4. Aufbereitung des Globins für die Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde das Globin in Probenpuffer¹ (2 µg/µl) gelöst und davon mit einer Mikropipette 20 µl auf die Gele aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in 5% iger Essigsäure bei 110 V für 6-8 Stunden.

2.4.1. Färbeprozess und densitometrische Messung

Im Anschluß daran wurden die Gele 16 Stunden in einer Färbelösung² fixiert und gefärbt.

Nach der Behandlung in einer Entfärbelösung³ stellten sich die verschiedenen Globinketten als blaue Banden dar (1). (Abb. 2.2)

1 Probenpuffer: 10 ml 8 M Harnstoff

0,8 ml Essigsäure

0,8 ml Mercaptoethanol

2 Färbelösung: 250 mg Coomassie blue

150 ml Methanol

30 ml Essigsäure

320 ml Aqua dest.

3 Entfärbelösung: entspricht 2 ohne Coomassie blue

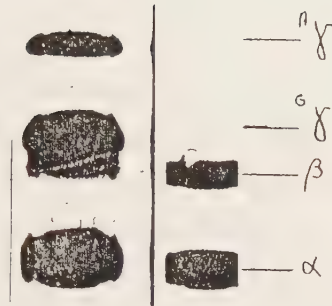


Abb. 2.2 Beispiel eines typischen Bandenmusters.
(links Fet, rechts Erwachsener)

Zur densitometrischen Auswertung wurden die Gele im Spektralphotometer¹ bei 550 nm Wellenlänge gemessen und die Densitometriewerte gleichzeitig von einem angeschlossenen Schreiber als Kurven (peaks) aufgezeichnet (Abb. 2.3)

1 Model 25 Spectrophotometer, Beckman Instruments,
München

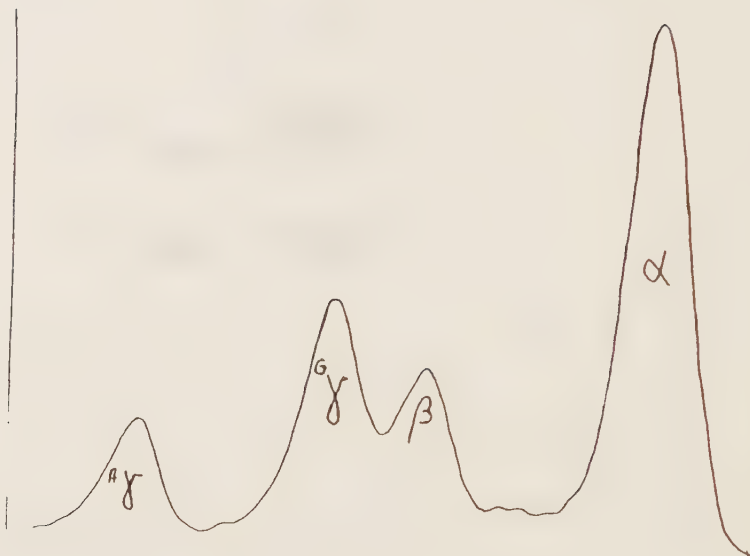


Abb. 2.3 Beispiel einer Densitometrie-Kurve (peaks).

2.5. Bestimmung der Verhältnisse $\frac{^G\gamma}{^G\gamma + ^A\gamma}$ und $\frac{\gamma}{\gamma + \beta}$

Bei kontinuierlicher Absorptionsmessung (Densitometrie) über die ganze Gel-Länge, erscheinen im Bereich der Globin-Banden Spitzen (peaks). Die den einzelnen Globinen ($\alpha, \beta, ^G\gamma, ^A\gamma$) entsprechenden peaks wurden auf schweres hochtransparentes Zeichenpapier kopiert, ausgeschnitten und auf einer Präzisionswaage¹ gewogen. Zusätzlich wurden die peaks integriert: durch Anlegen von Tangenten an die Wendepunkte der Kurven wurde ein Dreieck konstruiert, die Basis und Höhe desselben gemessen und die Fläche berechnet. Aus den Gewichten der ausgeschnittenen peaks und der Flächenintegration dieser peaks wurden rechnerisch die Verhältnisse $\frac{^G\gamma}{^G\gamma + ^A\gamma}$ und $\frac{\gamma}{\gamma + \beta}$ ermittelt. Beide Auswertungen führten zu nahezu identischen Zahlenwerten.

1 Sartorius Type 2414, Sartorius Werke G.m.b.H.,
Göttingen

2.6. Messung der in den einzelnen Globinen enthaltenen Radioaktivität und Bestimmung der "relativen Globin-Biosynthese-Raten"

Nach der densitometrischen Auswertung wurden die zu den einzelnen Globinketten gehörigen Banden aus den Gelen ausgeschnitten. Die Stücke wurden einzeln, nach Globinfraktionen getrennt, jeweils in ein Szintillationsgefäß gegeben. Dies enthielt 2 ml eines Gemisches aus Protosol¹, Toluol und H₂O im Verhältnis 6:3,5:0,5. Durch Inkubation bei 55 Grad Celsius über fünf Stunden, wurde das Protein aus den Gelen herausgelöst.

Anschließend wurden jeweils 5 ml Instagel² zugegeben und das Gemisch 48 Stunden bei Dunkelheit gekühlt, ehe die Flüssigkeitsszintillationszählung durchgeführt wurde. Der Kühlungsprozeß war notwendig, weil sich ansonsten durch Chemilumineszens falsch-hohe Zählraten ergaben.

1. NEN Chemicals, Dreieichenhain

Die vom Szintillationszähler³ ausgedruckten cpm (counts per minute) sind also proportional den während der Inkubationszeit von zwei Stunden unter Einbau radioaktiven Leucins neu synthetisierten Globinketten. Aus den cpm der ^{67}Sr - und ^{87}Sr -Banden konnte nun das Verhältnis $^{67}\text{Sr} / ^{67}\text{Sr} + ^{87}\text{Sr}$ der Biosyntheseraten errechnet werden.

2 Packard Instruments, Downes Grove, Ill., USA

3 Isocap/300, Liquid Szintillation System, Nuclear Chicago, USA

3. Ergebnisse

3.1. Bandenidentifizierung

Durch Carboxymethyl-Cellulose-Säulenchromatographie (8) chromatographisch rein dargestellte α - und β -Globine ergeben einzelne Banden an unterschiedlichen Stellen. Demgegenüber teilt sich gereinigtes γ -Globin aufgrund des Tritoneffektes in zwei Banden auf: in eine $^G\gamma$ - und eine $^N\gamma$ -Bande. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 3.1 dargestellt.



Abb. 3.1 Elektrophorese von α -, β - und γ -Globin (von links nach rechts), getrennt und gereinigt durch CMC-Harnstoff-Säulenchromatographie. (Jensen et al. (13))

3.2. Densitometrische Bandenmuster eines Feten und eines Neugeborenen

Das elektrophoretische Globinmuster eines Feten und eines Neugeborenen ist in Abb. 3.2 zu sehen: beim Feten ist ein kleiner Anteil β -Globin vorhanden, der beim Neugeborenen schon deutlich größer ist. Es ist in beiden Fällen klar zu sehen, daß der Anteil von γ -Globin den von α -Globin mengenmäßig übersteigt.

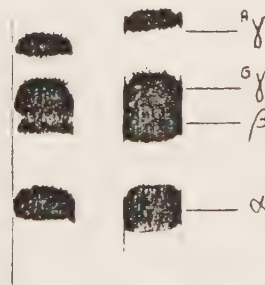


Abb. 3.2 Globinelektrophorese vom Blut eines Feten und eines Neugeborenen (von links nach rechts). (Jensen et al. (13))

3.3. Die $\frac{\gamma^G}{\gamma^G + \gamma^H}$ Verhältnisse bei Feten und Neugeborenen

3.3.1. Die relativen Anteile von γ^G und γ^H im Hb F

In Tab. 3.1 sind die $\frac{\gamma^G}{\gamma^G + \gamma^H}$ Globinverhältnisse von 5 gesunden Feten und 6 Neugeborenen zusammengefaßt.

Nr.	Alter nach Konzeption	$\frac{{}^G\gamma}{{}^G\gamma + {}^H\gamma}$
		Protein

Fetus		
1	19. Woche	0,72
2	20. Woche	0,70
3	20. Woche	0,71
4	21. Woche	0,68
5	21. Woche	0,68
Neugeborenes		
6	38. Woche	0,67
7	39. Woche	0,67
8	39. Woche	0,66
9	39. Woche	0,70
10	40. Woche	0,70
11	41. Woche	0,69

Tab. 3.1 $\frac{\gamma^G}{\gamma^G + \gamma^H}$ Quotient aus dem Protein

Der relative γ -Globinkettenanteil in Relation zum Alter ist in Abb. 3.3 graphisch dargestellt.

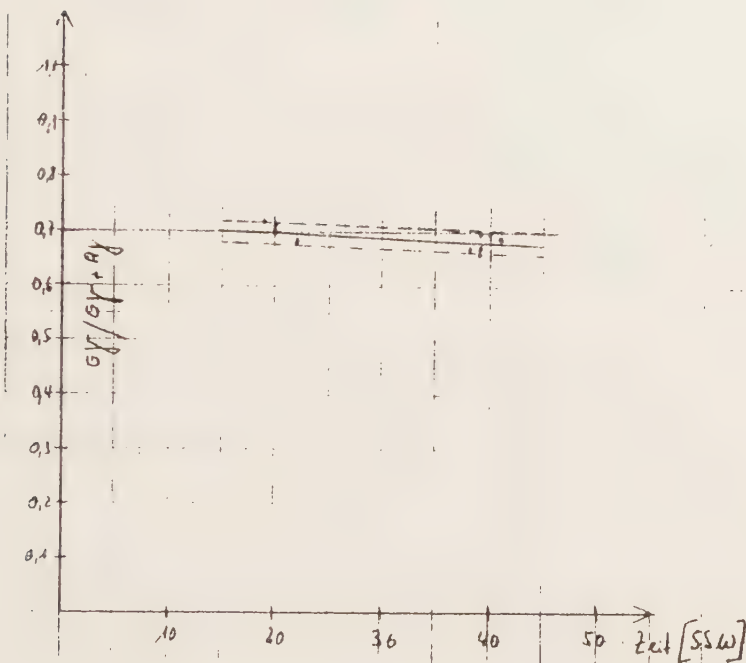


Abb. 3.3 Der relative γ -Globinanteil bei Feten und Neugeborenen in Abhängigkeit vom Alter. (Die unterbrochenen Linien begrenzen den Bereich ± 0.02)

Der relative $^G\gamma$ -Globinanteil, bestimmt an 5 Feten, beträgt zwischen 0,68 und 0,72, bei einem Mittelwert von 0.70 und einer empirischen Standardabweichung von $s = 0.02$.

Der relative $^G\gamma$ -Globinanteil, bestimmt an 6 Neugeborenen beträgt zwischen 0,66 und 0,70, bei einem Mittelwert von 0.68 und einer empirischen Standardabweichung von $s = 0.02$.

Zwischen der Gestationsdauer (19. - 41. Schwangerschaftswoche) und dem relativen $^G\gamma$ -Globinanteil besteht eine nicht signifikante Korrelation von $r = -0.46$.

Die Regressionsgerade lautet:

$$^G\gamma / ^G\gamma + ^n\gamma = -0.86 \times 10^{-3} \times |SSW| + 0.72$$

3.3.2. Die relativen Syntheseraten von $^6\gamma$ und $^n\gamma$

In Tab. 3.2 sind die $^6\gamma / ^6\gamma + ^n\gamma$ Syntheseverhältnisse von 5 gesunden Feten und 6 Neugeborenen zusammengefaßt.

Nr.	Alter nach	$\overset{G}{\gamma} / \overset{G}{\gamma} + \overset{n}{\gamma}$
	Konzeption	Synthese

Fetus		
1	19. Woche	0.69
2	20. Woche	0.69
3	20. Woche	0.69
4	21. Woche	0.71
5	21. Woche	0.68
Neugeborenes		
6	38. Woche	0.66
7	39. Woche	0.66
8	39. Woche	0.66
9	39. Woche	0.70
10	40. Woche	0.66
11	41. Woche	0.67

Tab. 3.2 $^6\gamma / ^6\gamma + ^n\gamma$ Quotient aus den Syntheseraten

Die Beziehung des Quotienten $\frac{\gamma^G}{\gamma^G + \gamma^H}$ in Relation zum Alter ist in Abb. 3.4 graphisch dargestellt.

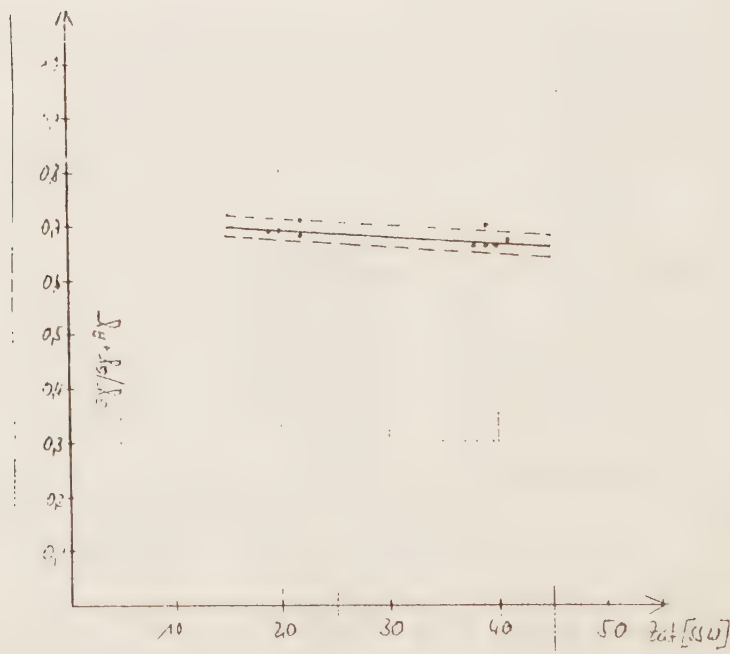


Abb. 3.4 Die relative γ^G -Globinsynthese bei Feten und Neugeborenen (Ordinate) in Abhängigkeit vom Alter. (Die unterbrochenen Linien begrenzen den Bereich $s = 0.02$)

Die relative γ^G -Synthese, bestimmt an 5 Feten, beträgt zwischen 0.68 und 0.71, bei einem Mittelwert von 0.69 und einer empirischen Standardabweichung von $s = 0.01$.

Die relative γ^G -Synthese, bestimmt an 6 Neugeborenen beträgt zwischen 0.66 und 0.70, bei einem Mittelwert von 0.67 und einer empirischen Standardabweichung von $s = 0.02$.

Zwischen der Gestationsdauer (19. - 41. Schwangerschaftswoche) und der relativen γ^G -Globinsyntheserate besteht eine nicht signifikante Korrelation von $r = -0.67$.

Die Regressionsgerade lautet:

$$\gamma^G / \gamma^G + \gamma^A = 1.22 \times 10^{-3} \times |SSW| + 0.72$$

3.4. Der Hb F Anteil bei Feten und Neugeborenen

Der Hb F Anteil der hier untersuchten Feten und Neugeborenen wird durch das Verhältnis $\gamma / \gamma + \beta$, welches ein Indikator des Hb F/(Hb F + Hb A)Verhältnisses ist (entspricht % Hb F), ausgedrückt. In Tab. 3.3 sind die $\gamma / \gamma + \beta$ Globinverhältnisse von 5 gesunden Feten und 6 Neugeborenen zusammengefaßt.

Nr.	Alter nach Konzeption	$\gamma / \gamma + \beta$ Protein

Fetus		
1	19. Woche	0,91
2	20. Woche	0,91
3	20. Woche	0,90
4	21. Woche	0,91
5	21. Woche	0,90
Neugeborenes		
6	38. Woche	0,77
7	39. Woche	0,77
8	39. Woche	0,79
9	39. Woche	0,68
10	40. Woche	0,59
11	41. Woche	0,56

Tab. 3.3 $\gamma / \gamma + \beta$ Quotient aus dem Protein

In Abb. 3.5 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt: Der Hb F Anteil beginnt von der 20. SSW ab langsam und von der 40. SSW ab steil abzufallen.

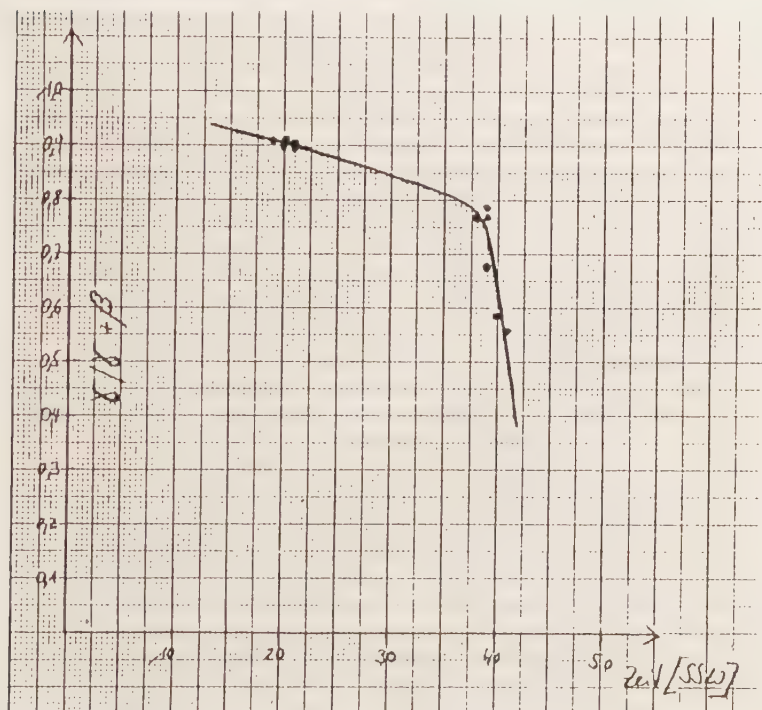


Abb. 3.5 Hb F Anteile in Abhängigkeit von der Zeit
(in Wochen)

3.5. Korrelation zwischen $\frac{\gamma^6}{\gamma^6 + \beta^n}$ und dem Anteil an Hb F

Die Korrelation zwischen der Hb F-Hb A-Umschaltung und dem relativen Anteil von γ^6 -Globin in vivo ist in Abb. 3.6 dargestellt.

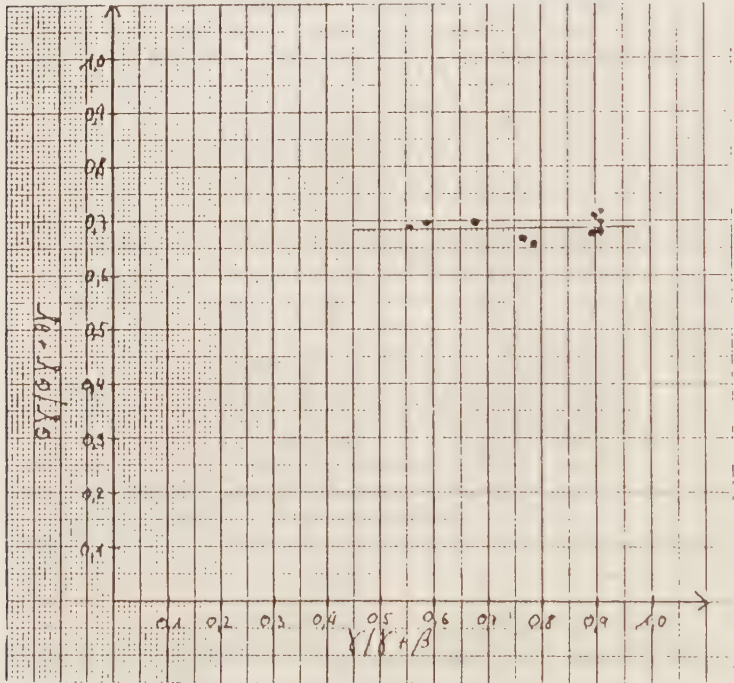


Abb. 3.6 Der Hb F Anteil in Abhängigkeit vom relativen γ^6 -Globinanteil

Die Regressionsgerade lautet:

$$\bar{y}^G / \bar{y}^G + \bar{y}^H = 0,01 \times \bar{y} / \bar{y} + \beta + 0,68$$

Der Korrelationskoeffizient $r = 0,1$ ist nicht signifikant.

Ein Zusammenhang zwischen dem Hb F Anteil und dem Verhältnis $\bar{y}^G / \bar{y}^G + \bar{y}^H$ im untersuchten Lebensabschnitt ist nicht festzustellen.

4. Diskussion

Die Hämoglobinumschaltung von 90% Hb F beim Feten zu weniger als 1% beim Erwachsenen ist umfassend untersucht worden. Dies betrifft unterschiedliche Methoden der Quantifizierung von Hb A und Hb F ebenso wie biosynthetische Verfahren (3,25,26).

Der Hauptanteil des Hämoglobins wird von blutbildenden Elementen des Knochenmarks synthetisiert. Nach der Freisetzung der erythroiden Zellen in den peripheren Kreislauf bleibt ihre Synthesefähigkeit nur noch für kurze Zeit bestehen. Das ist der Grund dafür, warum dann bei der Bestimmung der relativen Globin-Biosynthese-Raten mittels radioaktiver Aminosäuren, die in das Globin peripherer Erythrozyten eingebaut wurden, lediglich der Regulationszustand einer ganz bestimmten jungen Erythrozytenpopulation gemessen wird.

Mit dieser Methode konnte festgestellt werden, daß in der 32.-34. Schwangerschaftswoche die β -Globin-synthese anzusteigen beginnt und die γ -Globin-synthese abnimmt (14). Von da an läßt die Aktivität der γ -Globingene in den Zellen, die neu aus dem Knochenmark freigesetzt werden, zunehmend nach (5).

Dennoch sind die relativen Globinanteile in der Hb F Hb A₁-Umschaltungszeit nicht ausschließlich abhängig von Kontrollmechanismen der Globinsynthese, sondern auch vom turnover der Erythrozyten, mit anderen Worten davon, wie schnell ältere Erythrozyten mit viel Hb F durch jüngere mit wenig Hb F ersetzt werden. Der Hauptanteil des Hämoglobins ist ja in Erythrozyten enthalten, die gar kein Hämoglobin mehr produzieren und die in ihren individuellen Synthesephasen von den unterschiedlichsten Regulationseinflüssen abhängig waren. Anders ausgedrückt läßt sich sagen, daß Änderungen der relativen γ - und β -Globinsyntheseraten erst mit einer gewissen Verzögerung meßbare Änderungen auch der Globinzusammensetzung folgen.

Im Gegensatz zum Wissen um die perinatale γ - zu β -Globinumschaltung fehlen bislang Informationen, die die Umschaltung der relativen Anteile von γ^G - und γ^H -Globinen betreffen: von 70% γ^G in fetalem Hb F zu nurmehr 40% γ^G in adultem.

Wir haben die $^6\gamma$ - und $^n\gamma$ -Globinsyntheseraten und die relativen $^6\gamma$ und $^n\gamma$ -Proteinanteile bei Feten um die 20. Schwangerschaftswoche und reifen Neugeborenen gemessen. Es ergab sich, daß das Verhältnis $^6\gamma / ^6\gamma + ^n\gamma$ bei Feten und Neugeborenen im Zeitraum von der 20. SSW bis zur 40. SSW bei einer Standardabweichung von $s = 0.02$ nahezu konstant 0,7 beträgt (Abb. 3.3 und 3.4). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Alter et al. (1). Im selben Untersuchungszeitraum nahm jedoch der Prozentsatz an Hb F ($\gamma / \gamma + \beta$) von 91% bei den Feten auf 56% bei den Neugeborenen ab (Abb. 3.5). Diese Abnahme wird auch durch Ergebnisse anderer Autoren (1,6,15) bestätigt.

Ein Zusammenhang zwischen der Hb F-Hb A₁-Umschaltung und dem relativen Anteil von $^6\gamma$ -Globin (Abb. 3.6) ist bei einem nicht signifikanten Korrelationskoeffizienten von $r = 0,1$ im Untersuchungszeitraum von der 20.-40. Schwangerschaftswoche nicht erkennbar. Da aber Neugeborene weniger Gesamt- γ -Globin besitzen als Feten in der 20. Schwangerschaftswoche (Abb. 1.2), muß dies bedeuten, daß in der Spätschwangerschaft die Abnahme der Synthese beider γ -Globine etwa proportional erfolgt.

Die Anteile von γ^G - und γ^H -Globin im Hb F wurden bei Feten um die 20. Schwangerschaftswoche und reifen Neugeborenen bestimmt. Das Verhältnis $(\gamma^G / \gamma^G + \gamma^H)$ betrug bei beiden Gruppen 0,7, bei einer Standardabweichung von $s = 0,02$. Im selben Untersuchungszeitraum verringert sich demgegenüber der Anteil an Hb F $(\gamma / \gamma + \beta)$ von 91% bei den Feten auf 56% bei den Neugeborenen.

Ein Zusammenhang zwischen der Hb F-Hb A₁-Umschaltung und dem relativen Anteil von γ -Globin ließ sich bei einem nicht signifikanten Korrelationskoeffizienten von $r = 0,1$ im Untersuchungszeitraum von der 20.-40. Schwangerschaftswoche nicht erkennen.

Dieser Sachverhalt läßt den Schluß zu, daß in der Spätschwangerschaft die Abnahme der Synthese beider γ -Globine proportional erfolgt.

6. Literaturverzeichnis

1. Alter, B.P.: The γ : β composition of fetal hemoglobin in fetuses and newborns. Blood 54: 1158 (1979)
2. Alter, B.P., Modell, C.B., Fairweather, D. et.al.: Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. N Engl J Med 295: 1437 (1976)
3. Bard, H.: Postnatal fetal and adult hemoglobin synthesis in early preterm newborn infants. J Clin Invest 52: 1789 (1973)
4. Betke, K.: Fetal hemoglobin in health and disease. Proc. 8th Int. Congr. Hemat. Tokyo, pp 1033-1040 (1960)
5. Buddecke, E.: Grundriss der Biochemie. de Gruyter 1977
6. Bunn, H. F., Forget, B. G., Ranney, H. M.: Human hemoglobins. W. B. Saunders Company, Philadelphia/London/Toronto, 1977

7. Cividalli, G., Nathan, D. G., Kan, Y. W.,
Santamaria, B. und Frigoletto, F.: Relationship
of beta to gamma synthesis during the first
trimester. An approach to prenatal diagnosis of
thalassemia. Ped. Res. 8, 553 (1974)
8. Clegg, J. B., Naughton, M. A., Weatherall, D. J.
(1966) Abnormal human hemoglobins: separation
and characterization of the α and β chains by
chemotography and the determination of two new
variants, Hb Chesapeake and Hb J (Bangkok)
J Mol Biol 19: 91
9. Deisseroth, A., Nienhuis, A., Turner, P. et al.
(1977) Localisation of human alpha globin
structural gene to chromosome 16 in somatic cell
hybrids by molecular hybridization assay. Cell
12, 205-218.
10. Huehns, E. R., Hecht, F., Keil K. V. und
Motulsky, A. G.: Developmental hemoglobin
anomalies in a chromosomal triplication, D_1
trisomy syndrome. Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 89
(1964)

11. Huehns, E. R., Dance, N., Beaven, G. H., Hecht, F. und Motulsky, A. G.: Human embryonic hemoglobins. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 19, 327 (1964)

12. Jensen, M.: Fetal globin synthesis and prenatal diagnosis of thalassemia. 28th Int. Congress of physiol. sciences, Budapest 1980, Adv Physiol Sci Vol 6, 153-163

13. Jensen, M., Attenberger, H., Schneider, Ch. and Walther, J. U. (1982) The developmental change in the $^6\gamma$ and $^H\gamma$ globin proportions in hemoglobin F. Eur J Pediatr 138: 311-314

14. Jensen, M., Rauch, A., Zahn, V., Loukopoulos, D.: Prenatal diagnosis of β -thalassemia. Report on 14 attempts. Klin Wschr 57: 37 (1979)

15. Jensen, M. und Zahn, V.: Fränataldiagnostik und genetische Beratung der Thalassämien. Monatsschr. Kinderheilkd. 127, 711-713 (1979)

16. Jensen, M., Zahn, V.: Fetoskopie, eine neue Methode in der pränatalen Diagnostik. Münch Med Wschr 118: 625 (1976)

17. Kaltsoya, A., Fessas, P. und Stavropoulos, A.:
Hemoglobins of early human embryonic development.
Science 153, 1417 (1966)
18. Lebo, R.V., Carrano, A.V., Brukhart-Schulze, K.
et al. (1970) Assignment of human β -, γ - and
 δ -globin genes to the short arm of chromosome 11
by chromosome sorting and DNA restriction enzyme
analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76,
5804-5808
19. Perutz, M.F.: Röntgenanalyse des Hämoglobins.
Angew. Chemie 75, 589 (1963)
20. Rovera, G., Magarian, C., Borum, T.W.:
Resolution of hemoglobin subunits by electropho-
resis in acid urea polyacrylamide gels contain-
ing Triton X-100. Anal Biochem 85: 506 (1978)
21. Schmidt, R.F., Thews, G.: Physiologie des
Menschen. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-
New York 1976
22. Schroeder, W.A., Huisman, T.H.J., Shelton, J.R.,
Shelton, J.B., Kleihauer, E., Dozy, A.M. und
Robberson, B.: Evidence for multiple structural
genes for the γ -chain of human fetal hemoglobin.
Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 537 (1968).

23. Schroeder, W.A., Huisman, T.H.J., Shelton, J.R.,
Wilson, J.B.: An improved method for
quantitative determination of human fetal
hemoglobin. Anal Biochem 35: 235 (1970)
24. Schwartz, E.: Abnormal globin synthesis in
thalassemic red cells. Sem. Hemat. 11, 549
(1974)
25. Terrenato, L., Bertilaccio, C., Spinelli, P.,
Colombo, B.: The switch from hemoglobin F to A:
the time course of qualitative and quantitative
variations of hemoglobins after birth.
Brit J Hematol 47: 31 (1981)
26. Weatherall, D.J., Pembrey, M.E., Frichard, J.:
Fetal hemoglobin. Clin Hemotol, Vol 3: No. 2,
467 (1974)

Lebenslauf

Name: Christian Schneider

Geburtsdatum: 15. August 1954

Geburtsort: Bockum-Hövel

Eltern: Vater: Dr. med. Hans Schneider, Internist
Mutter: Marlies Schneider, geb Zumbroich,
Hausfrau

Wohnort: Fachemstr. 9, 8000 München 80
Tel.: 089/437657

Familienstand: ledig

Schulausbildung: 1961-1965 Marien-Grundschule in Meschede
1965-1970 Gymnasium der Benediktiner in
Meschede
1970-1972 Städt. Neusprachl. Gymnasium in
Neheim-Hüsten
1972-1975 Gymnasium der Benediktiner in
Meschede, Erwerb des Reifezeugnisses

Bundeswehr: 1975-1976 Grundwehrdienst

Studium: 1977-1984 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians Universität München
1984 Approbation

Beruf: Seit Nov. 1984 Assistenzarzt am Städt.
Krankenhaus München-Neuperlach,
II. Medizinische Abteilung

